Quick Guide

LSM 5Family

Laser Scaning Microscope

LSM Software ZEN 2009

August 2009

ZEISS

We make it visible.

LSM510　取り扱い注意点（最初にお読みください）

1、レーザーモジュールに関して

・空冷アルゴンレーザーの空冷ファンの上には何も載せないで下さい。
・空冷アルゴンレーザー、ヘリウムネオンレーザーの電源コードには触れないで下さい。
・レーザーモジュールの白いカバーの上には何も置かないで下さい。
・レーザーモジュールのボックスから出ているオプティカルファイバー（銀色のケーブル）には触れないで下さい。

2、スキャニングモジュールに関して

・スキャニングモジュールの上には何も載せないで下さい。
・スキャニングモジュールにつながっているオプティカルファイバー（銀色のケーブル）には触れないで下さい。

3、顕微鏡に関して

・レーザー顕微鏡で画像を取り込んでいる最中は対物レンズから見えているレーザー光、散乱光を直接覗きこまないようにしてください。失明するおそれがあります。
・対物レンズにオイルをつけた場合には、レンズクリーニング液（以下の混合溶液：n-ヘキサン　85%、イソプロパノール　15%）で良くふき取っておいてください。倒立型顕微鏡の場合、オイルがレンズの内部に浸潤し、正しい状態での検鏡が出来なくなる恐れがあります。
・使用中に対物レンズ及びレボルバーに水溶液等をこぼしてしまった場合、直ちにふき取ってください。特に生理・・食塩水の場合には対物レンズ、及びレボルバーの部分がサビてしまう恐れがあります。水漏れが起こった場合には直ちに弊社担当者までご連絡下さい。
・蛍光観察用の水銀ランプは高温になります。点灯中、及び消灯後しばらくは手を触れたり、ダストカバーをかけないようにしてください。やけどや発火の恐れがあります
・使用中、顕微鏡につながっている電源ケーブルや各種ケーブル等は外さないで下さい。故障の原因になる恐れがあります。

4、ECU（灰色のボックス：ボード等の入っているボックス、多くのケーブルが出ています）について

・ケーブル類は外さないで下さい。

5、コンピューターに関して

・MO に保存してあるデーターを表示させた状態でディスクを取り出さないように下さい。保存してあるデーターが破壊される可能性があります。

1、システムの起ち上げ(電源の入れ方)

・水冷UVレーザモジュール(オプション)や蛍光水銀ランプの電源は、システム全体の電源とは別になっています。以下の手順に従って電源の操作をお願いします。

手順を大別すると

1-1、 E-Box(電気系ボードの入った大きなボックス)の電源パネルを操作する

1-2、 卓上の電源パネルを操作する

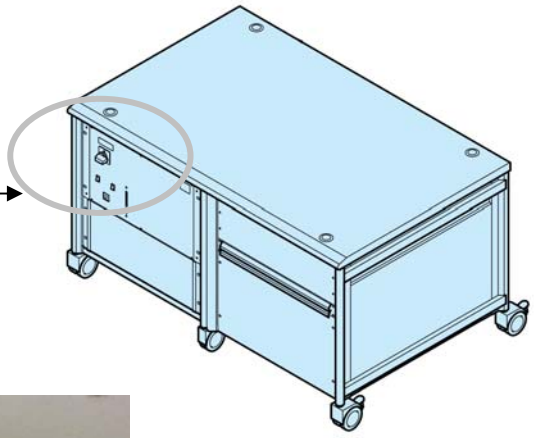
1-3、 水銀ランプの電源を入れる

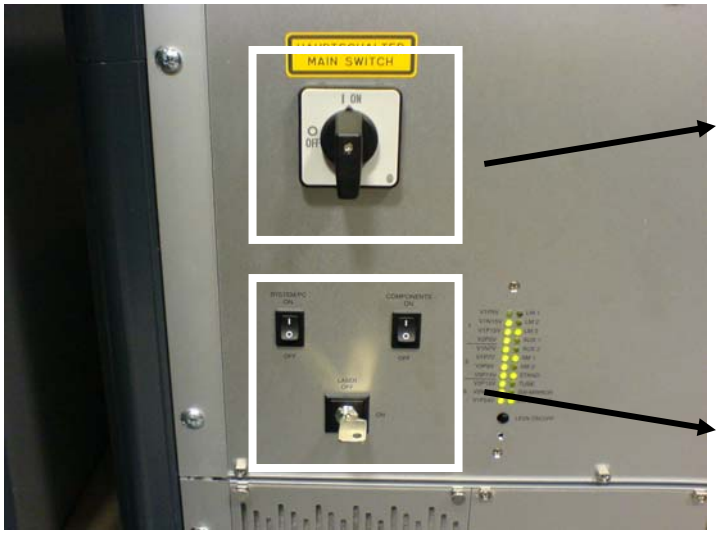
1-4、 パソコンの電源を入れる

1-1、E-Boxの電源を入れる

- 通常は 1 つのスイッチのみ操作します(その他のスイッチは常に ON の状態にしておいてください)。
- 最初にシステムに備え付けの E-Box のパネルの位置をご確認下さい

このボックスの正面に位置します。(場合によっては見辛い状態にあるかもしれません。上にレーザモジュールが載っています。)





主電源。
通常、このスイッチのみを On/Offします。

補助スイッチ。
常に On にしておきます。
Off の状態にある場合は、
On にして下さい。

1-2、卓上の電源パネルを操作する

- 卓上に右写真のようなスイッチのついた電源パネルがあります。
  これらのスイッチを入れます。
- SYSTEM/PC：パソコンとモニタの主電源
- COMPONENTS：上記以外の電源

・画像取得を行う場合：どちらも ON にします。
・パソコンのみ使用する場合：SYSTEM/PC だけを ON。

1-3、水銀ランプの電源をONにします。

- 備え付けの水銀ランプ電源を ON にします。
  （仕様により異なりますので、説明時にご確認下さい）

1-4、パソコン本体の電源をONにします。

- ２の操作時にパソコンが自動でONになる場合もあります。
  システムにより違いますので説明時にご確認下さい

・モニタの指示に従ってWindows を正常に起ち上げます。
Windowsへのログインは、パスワードを入力しOKをクリックして下さい。
納入時においてパスワードは特に設定をしておりません。

注意）電源の ON/OFF は **REMOTE CONTROL** スイッチからの集中電源方式となっております。個別に電源の ON/OFF を行うとトラブルの原因となる可能性があります。

2、オペレーティングソフトの起ち上げ

・コンピューターを正常に起ち上げると、以下のようなデスクトップ画面が現れます。

Fig1.デスクトップ画面

・**【ZEN 2009】**というアイコンをダブルクリックして、オペレーティングソフトを起ち上げて下さい。

Fig2.ZEN アイコン

・数秒後、以下のようなウインドウが現れますので、**【Start System】**を選択して下さい。

Fig3. ソフト起動直後の画面

“Start System”:画像取得時に選択。ソフトウェアとハードウェアをイニシャライズして起動。

“Image Processing”:ソフトウェアのみ起動。取得済の画像を扱うときに選択。

→このモードで起動すると画像の取り込みは出来ません！！

※Boot status の三角マーク(画面c、白丸)をクリックすると、起動状態の確認をすることが出来ます。

・ソフトウェアが完全に起動すると、ZEN メインアプリケーションウインドウが表示されます（Fig4,5）。ZEN のユーザーインターフェースを快適に使用するために、フルスクリーン表示にすることをお勧めします。

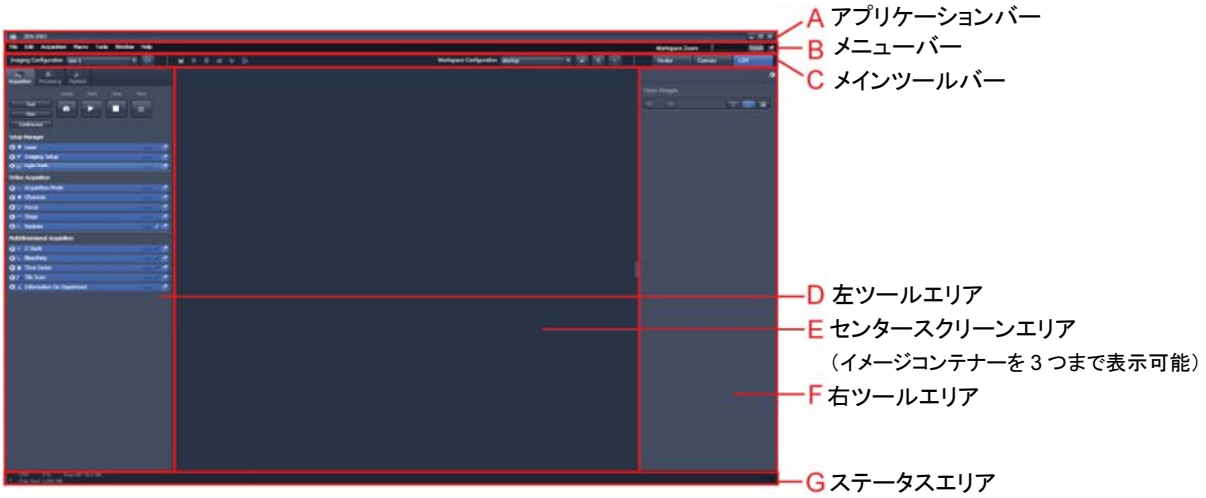
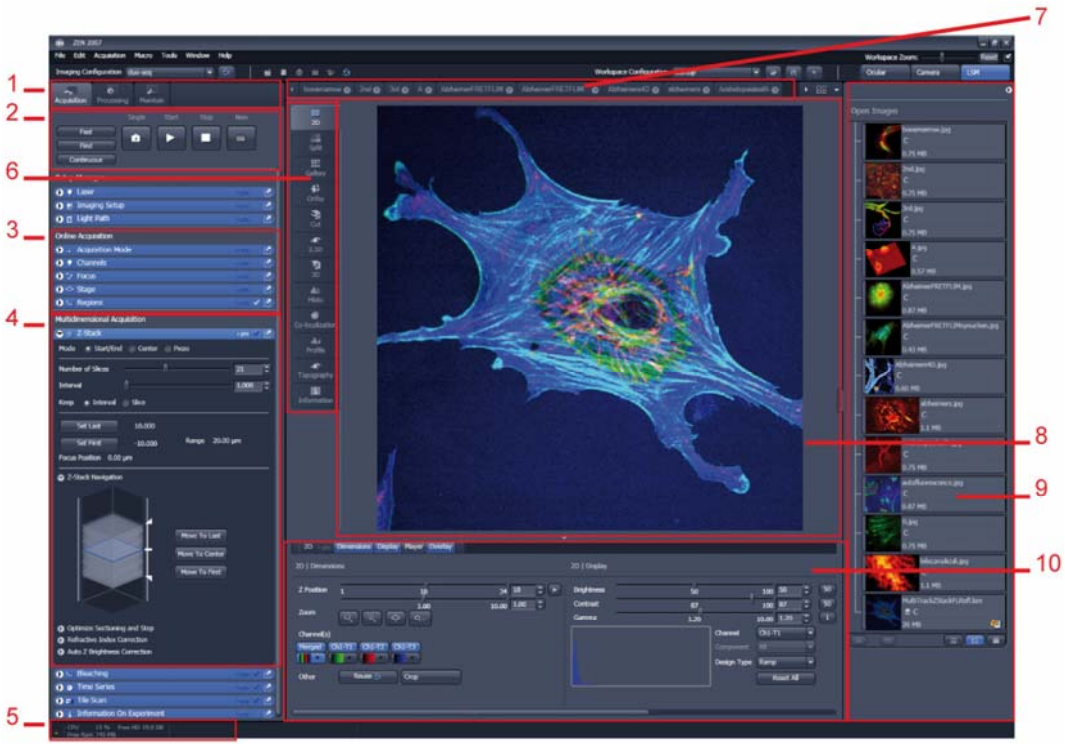


Fig4.ソフト起動後の ZEN メインアプリケーションウインドウ（画像は開いていない状態）



1、 メインタブ
2、 アクションボタン
3、 ツールグループ
4、 ツール
5、 ステータスバー
6、ビュータブ
7、イメージタブ
8、画像表示部分
9、ファイルハンドリングエリア
10、ビューコントローラー

Fig5.ソフト起動後の ZEN メインアプリケーションウインドウ（複数画像を開いた状態）

3、ソフトウェアの基本操作

ZEN インターフェースは左、中央、右と 3 つの大きなワークエリアに区切られています。

左ツールエリア

光学顕微鏡の制御や画像取得のための諸操作を行います。(Fig3-①,②,③)

① メインタブ　② アクションタブ　③ ツールグループ

センタースクリーンエリア(Fig3- ④,⑤,⑥)

取得した画像が表示されます。(一度に 3 枚までの画像を同時に表示可能です)

④ 画像ウインドウ　⑤ ビュータブ　⑥ ビューコントローラー

右ツールエリア

現在メモリー上で開いている画像をサムネイル表示します。

⑦ サムネイル画面 (画像取得後に表示)

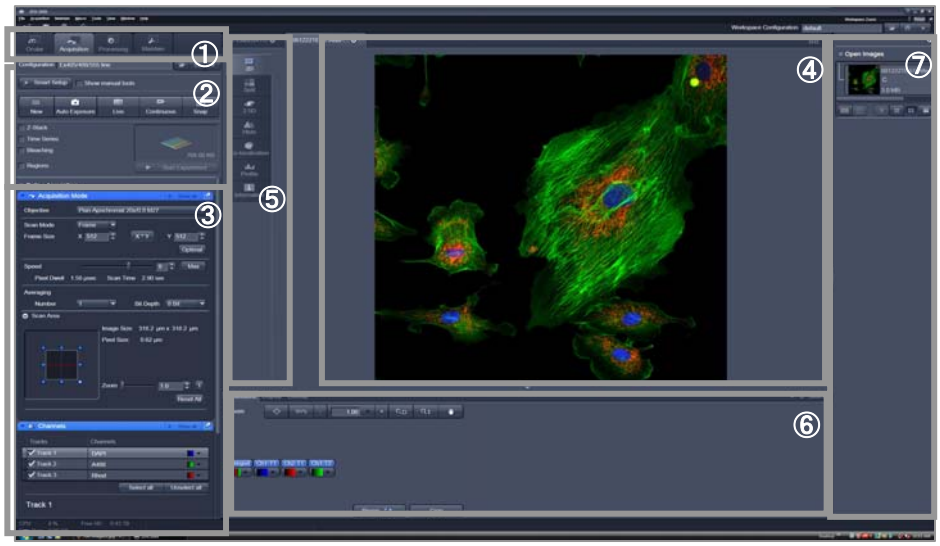


Fig6.ソフト起動後の ZEN メインアプリケーションウインドウ

※ ZEN は表示の関係上、比較的広い画面での仕様を推奨しています(30 インチワイドモニタ もしくは 24 インチモニタ)
ZEN のユーザーインターフェースを快適に使用するために、フルスクリーン表示にすることをお勧めします。

Show all

Show all にチェックを入れると、設定できる項目が全て表示されます。
これにより、さらに詳細な画像取得条件を設定することができます。

Fig.7 Show all

ワークスペースズーム

左右ツールエリアとセンタースクリーンエリアの表示（拡大）比率を変えることができます。

ツールエリアのコーディネート

ツールカラムのタイトルバーをドラッグアンドドロップすることで、レイアウトを自由に変更することができます。
また、それぞれのツールは青いタイトル部分をクリックすると開閉をすることができます。
左ツールエリアの各ツールは、タイトルバー右に配置したアンドックボタンの on/of により、画面上のどこにでも自由に配置できます。

Fig.8 ZEN ウインドウレイアウトの為の各種機能

その他の機能

左ツールエリアにおいて、自分がいつも繰り返し行う作業がある程度決まっていれば、そのツールの配置を自分だけのレイアウトとして保存しておくことが可能です（Workspace Configuration）。
ソフトウェア起動後、2 クリックで呼び出すことができます。

※ここでは使用する上で最低限必要な機能を記しています。より詳細な機能については英文の取扱説明書をご参照ください。

4、画像を取得する

・LSM510で画像を得るための基本的な流れは次のようになります。

Ⅰ、レーザ発振させ、出力の設定を行う

↓

Ⅱ、顕微鏡観察を行い、観察場所の確認を行う

↓

Ⅲ、観察する蛍光試薬に対応したレーザ蛍光の光路を設定する

↓

Ⅳ、レーザスキャンを行い、画像を得る

・画像を得るための操作は**【Acquisition】**以下のボタンを使用します。

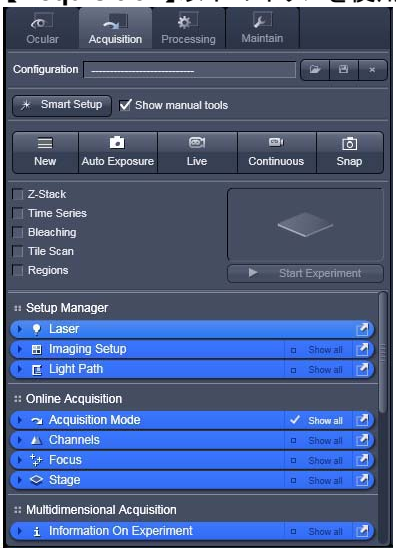


Fig.9 Acquisition 画面

4－Ⅰ、Laser Control（レーザ発振させます）

・左ツールエリア内の【Setup Manager】内の“Laser”ツール（常にリストの一番上にあります）を開き、自分が使用するレーザ発振させます。

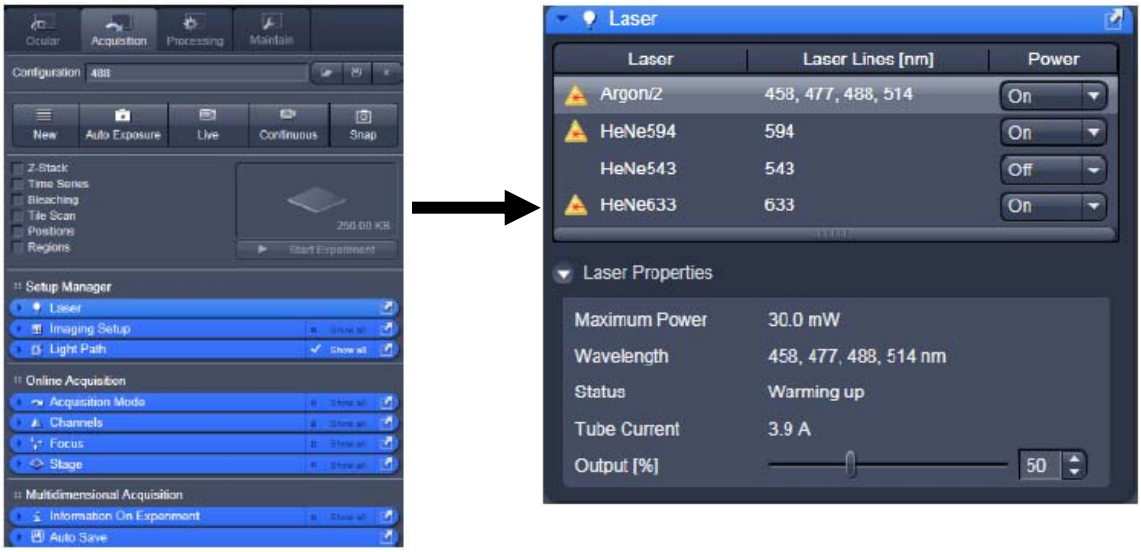


Fig.10 レーザコントロールツール

☆　レーザ立ち上げについて

・**Blue Diode 405（405nm）**

standby をクリックします。

Laser Properties を開き、Status の表示が Warming up から Ready に変わったら on をクリックします。

・**Argon/2（458/477/488/514nm）**

standby をクリックします。

Laser Properties を開き、Status の表示が Warming up から Ready に変わったら on をクリックします。

その後、Output(%)を 50 まで上げます。

・**HeNe(543nm、594nm、633nm)**

on をクリックします。

☆それぞれ使用するレーザ発振後、10 分程度レーザ安定させるために待機します。

4－Ⅱ、Microscope Setup（サンプルの位置決めをします）

顕微鏡本体のボタンもしくは下記ウインドウから顕微鏡を操作し、接眼観察をしてサンプルの位置決めを行います。

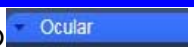
双眼鏡筒へ光路を切り替える

接眼観察を行う際は、画面左上にある **Ocular** をクリックし **Online**ボタンを選択します。

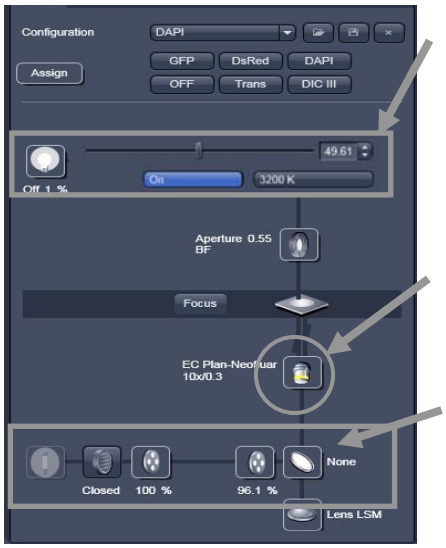
※この状態でのレーザによる画像の取り込みはできません

Fig.11 光路切り替えボタン(接眼観察)

顕微鏡各部の制御

左ツールエリア内の 

ツールをクリックします。このツール上では光学顕微鏡の電動駆動部分がボタンで表示されており、各部の選択により顕微鏡を操作することができます。



<u>透過光路（透過光観察時に使用）</u>

・ここでは透過光路に関する各種選択が可能です。
・ハロゲンランプの on/off、光量調整などができます。
（仕様により制御できる部分が異なります）

<u>対物レンズの切り替え</u>

・対物レンズのボタンをクリックします。任意の倍率のレンズを選択すると自動的に切り替えが行われます。

<u>反射光路（蛍光観察時に使用）</u>

・ここでは蛍光光路に関する各種選択が可能です。
・蛍光フィルタの選択/シャッタの開閉/光量調整などを制御します（装備しているパーツにより制限があります）。

Fig.12 顕微鏡制御画面（Axio Observer Z1 の例）

顕微鏡設定の保存と呼び出し（Fig.14）

蛍光観察、もしくは透過光観察時に使用する設定は、ソフト上で保存し、簡単に呼び出すことが出来ます。

呼び出し：マクロボタンから任意の設定を選びクリックします。

Fig.13 顕微鏡設定の呼び出し画面

4－Ⅲ、Configuration（LSM の光路を設定します）

・ここではレーザ微鏡画像を得るために必要な光路の設定を行います。

搭載しているレーザ種類によって、観察可能な蛍光試薬に対する光路はあらかじめ登録してあります。

Fig.14 光路切り替えボタン(LSM)

・ここからはレーザ微鏡でのセッティングになりますので、“LSM”の方に顕微鏡の光路切り替えをしてください。

コンフィグレーションの選択(単染色で画像取得)

① **Configuration** の ボタンをクリックすると、登録されている光路設定リストが開きます。

② リスト (Fig.13)の **Recent** または **Configurations** より、目的の光路設定を選択します。

※ **Search** より登録済みの光路名を入力することで、設定を検索することができます。

例）単染色の場合、Ex 488 など励起波長が 1 波長のみで表示されているものを選択します。

多重染色の場合、Ex 488/555/639 など 2 波長以上表示されているものを選択します。

Fig.15 Configuration 呼び出し画面

Fig.16 Configurationsリスト 画面

※ **及び** **はそれぞれ設定を上書き、消去するためのボタンです。**

必要のない限り押さないよう注意してください。

③ ツールエリア内の **Imaging Setup**、**Light Path** ツールを開き、光路を確認します。

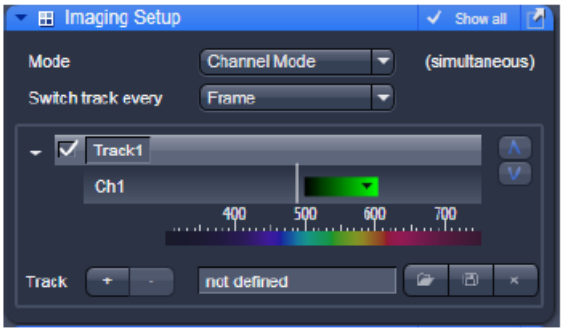


Fig.17 Imaging Setup

Simultaneous

単染色、又は多重染色時の同時励起を行う時に使用します。

Sequential

多重染色時、蛍光の漏れこみ（クロストーク）が顕著な時に使用します。

必要があれば光路設定を変更し、名前をつけて Configuration リストに登録しておくことも可能です。

《 光路設定の確認、変更 》

Imaging Setup、**Light Path** ツールを開きます。**Imaging Setup** ツールで選択した **Track** の光路が、**Light Path** ツールで表示されます。

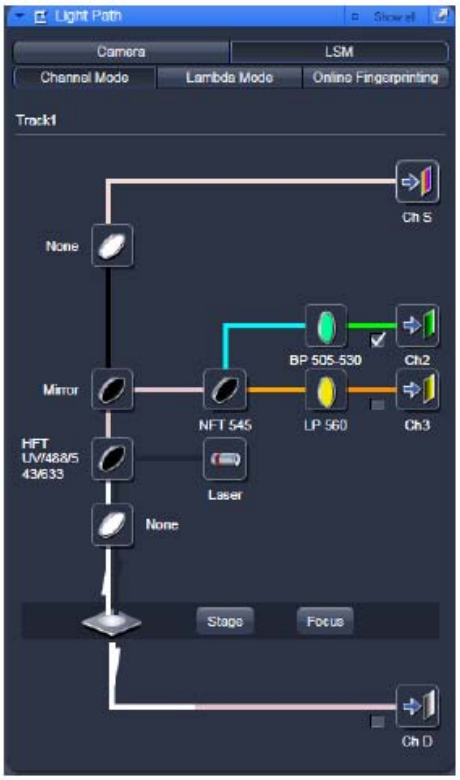


Fig.19 Light path ツール

使用するレーザ波長と照射強度の設定

メインダイクロイックビームスプリッター（HFT）

使用する検出器（PMT）と使用するフィルタ

画像取得後の擬似カラーの選択

4－Ⅳ、Scan Control

スキャニングして画像を取得する

ここでは実際に画像を得るための操作を行います。レーザスキャンで画像を得る上でも、いくつかの手順がありますので、順を追って解説します。

1: Channels・・・・・・・画像のコントラスト＆ブライトネス、ピンホールの大きさ、レーザパワー（AOTF）の調整を行います。

2: Auto Exposure・・・・・・・サンプルの明るさに応じて自動的に Gain と Digital Offset を決めます。

3: Gain(master) & Digital Offset・・・検出機の感度の調整を行います。

4: Acquisition Mode・・・画素数、スキャンスピードやアベレージングの調整をします。

画像を作るには１～４の各調整ポイントをそれぞれ調整します。
調整の仕方は試料の特性、各人の好みにより若干異なります。

共焦点ピンホールサイズの設定

1: Channels Mode

・左ツールエリアの【**Acquisition**】の【**Channels**】をクリックすると、以下のウインドウがあらわれます。

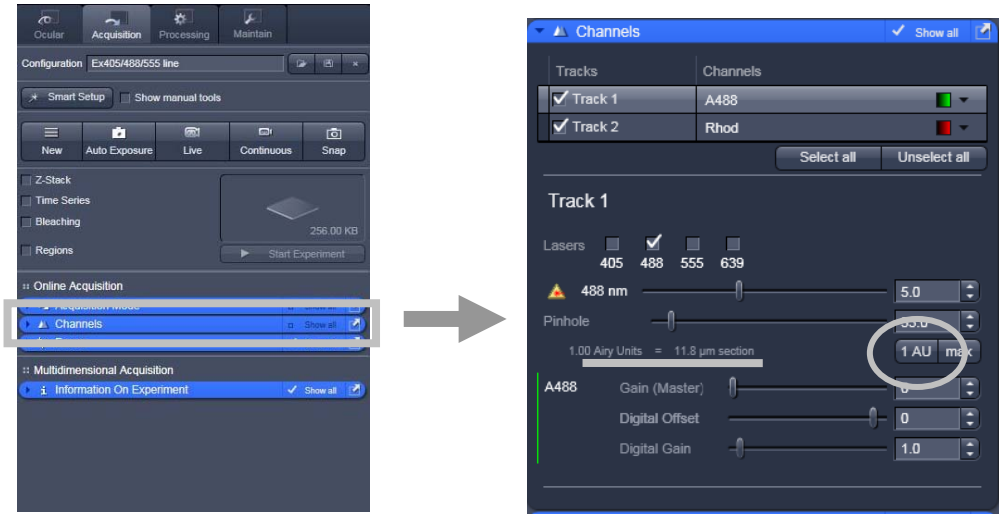


Fig.20 Channels ツール

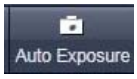
・ピンホールサイズを **1AU** に設定することで、使用している条件において計算上最適なピンホールサイズを設定することができます。 1 AU をクリックすると 1 Airy Units になります。
（サンプルのシグナルの状態によってはピンホールを開いて使用することもあります）。
この時、計算上取得している光学セクショニング厚を確認することができます。

Image acquisition（スキャニングし、画像を表示する）

2: Auto Exposure

サンプルの明るさに応じて自動的に Detector Gain と Amp Offset を調整し、画像を取得します。

・サンプルにレーザを照射する場合には**“Auto Exposure”**以外に、**“LIVE”**、**“Continuous”**、**“Snap”**などのボタンも使用します。
・連続スキャンをしている場合は調整終了後、**“Stop”**でスキャニングを止めます。（LIVE、Continuous では退色防止の為に必須です。）



サンプルの明るさに応じて自動的に Gain(master)と Digital Offset を決めます。

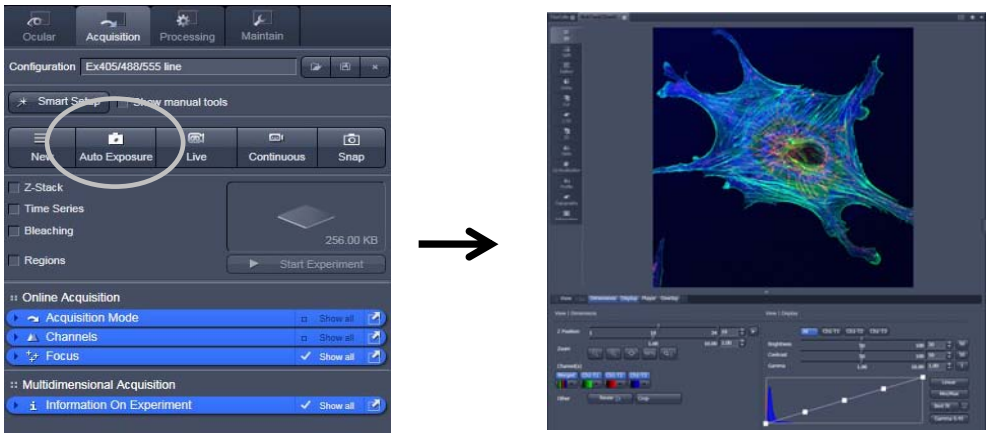
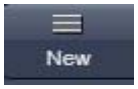
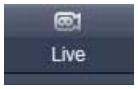


Fig.21 Auto Exposure ボタン

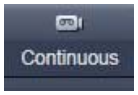
注） 前項までの操作で画像が上手く現れない場合、ピントがずれている可能性があります。
Live、Continuous ボタンを使用し、スキャンしながら顕微鏡のフォーカスノブをまわしピントの調整を行います。必要があれば再び Auto Exposure ボタンを使って画像を表示します。



新しい画像ウインドウを表示します。

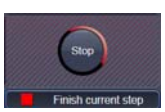


一番速いスピードで連続スキャンをします。Master Gain や Z スタックフォーカシングなどの各種調整時に使用します。



設定したスキャンスピードの状態で連続スキャンをします。Master Gain などの各種調整時に使用します。

シングルショットのボタンです。1 画像取得したらスキャンは自動的にストップします。Average などの各パラメーターを設定後に使用します。



スキャンを止めるボタンです。
※ **Live** や **Continuous** を使用した後は退色を防ぐためにこまめにスキャンをストップしましょう。

画像の最適化(Gain (Master) /Digital Offset を調整する)

3-1: Gain (Master) & Digital Offset

【**Auto Exposure**】で調整された検出器の感度/オフセットは、輝度の強いシグナルがサチュレーションしない程度に調整を行いますので、100%オペレーターの望む画像になるとはいえません。

画像をスキャンしながらGain (Master)と Digital offsetを調節し、画像の調整を行いましょう。

・左ツールエリアの【**Acquisition**】の

をクリックすると、連続スキャンが開始されます。

・連続スキャン中に【**Acquisition**】の【**Channels**】を開き任意の明るさになるように、以下の部分の調整を行い、

お好みの画像を作成して下さい。

・調整が終わったらスキャンを【**Stop**】し て下さい。

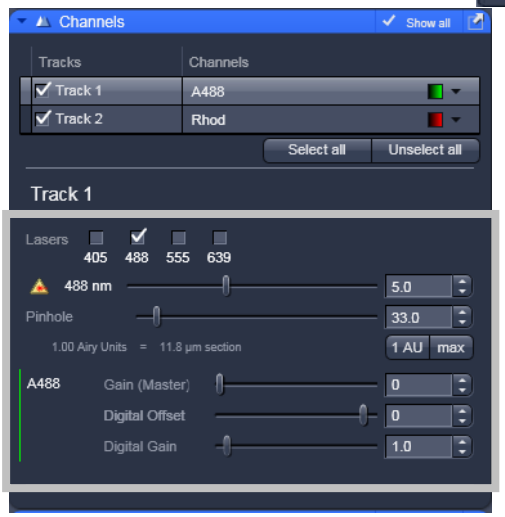


Fig.22 Channels ツール

Lasers ：各レーザ波長の照射強度の調整

Master Gain ：検出器の感度調整

Digital Offset ：バックグラウンドレベルの調整

Digital Gain ：検出したシグナルを電気的に増幅する機能。

◎参考

・Gain で検出範囲の上限を決めます

・Digital Offset で検出範囲の下限を決めます

・透過像の作成時画像全体のムラを少なくするには Digital Offset を切り過ぎない方が良いです。

・サンプルに無駄な光を当てないように(出来るだけ蛍光の褪色を防ぐために)こまめにスキャンをストップさせましょう。

・Transmission で各波長のスクロールバーを動かしてレーザパワーを設定します。

褪色の激しいサンプルの場合は%を落としてスキャンするようにします。

注)サンプルにより最適なレーザパワーは変わります。サンプル毎にテストを行い、適切な値を決めるようにしてください。特に 488nm に関しては、5～10%程度からはじめてみてください。

画像の最適化（Range Indicator を目安に Master Gain/ Digital Offset を調整する）

3-2: Range Indicator

・センタースクリーンエリア下にあるビューコントローラーの中の**【View – Dimension】**から設定します。

・Ch 名の付いたボタンの直下の**擬似カラーの部分をクリック**。ここが Fig21 のようにグレースケールの表示に変わると Range Indicator に切り替わります。

※この表示の右側▼を

クリックすると擬似カラーリストが現れます。

Fig.23 Dimensions コントロール画面

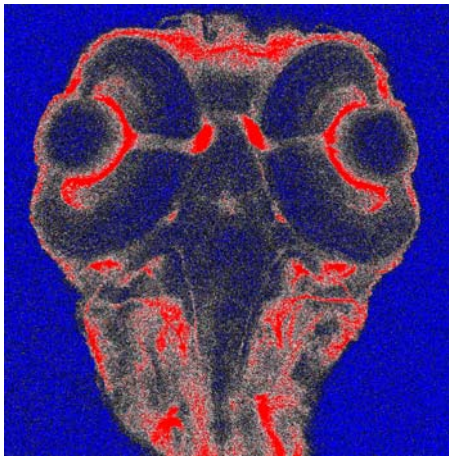


Fig.24 Range Indicator 表示

・擬似カラーを**Range Indicatorに変更**すると、サチュレーションしたピクセルは赤に、輝度値0の情報は青に、ダイナミックレンジに収まっている情報はグレースケールで表現されます。

・注目している部分に**赤や青の情報がなくなるように** Detector Gain / Amp Offset を調整します。

☆レーザ度の調整（退色があまり問題にならない場合）

・ピンホールを 1Airy に設定します（Fig.20）。

・Detector Gain を高めに設定しておきます。（おおよそ 1000～1100 の間に調整）(Fig.22)

・この状態でサチュレーションしている場合は“Channel”ツールの中のレーザコントロール部分で使用している励起波長の%を落とします。(Fig.22)

※蛍光の退色が激しい場合、レーザ度を十分に下げ、Intensity を稼ぐためにピンホールを必要分開きます。

スキャニングのためのパラメーターセッティングについて

4: Acquisition Mode

・左ツールエリアの【**Acquisition**】の【**Acquisition Mode**】をクリックすると、以下のウインドウがあらわれます。

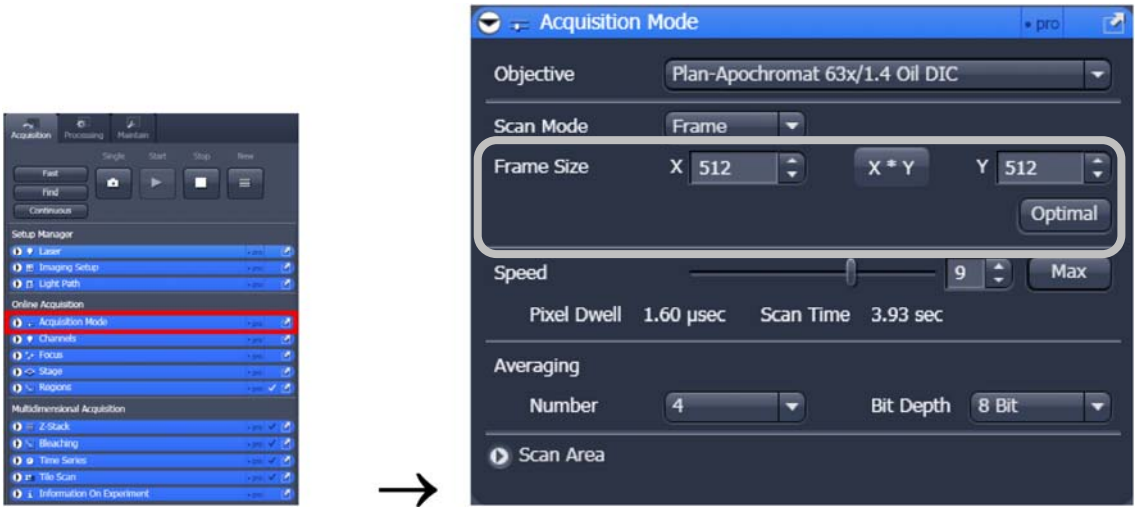


Fig.25 Acquisition Mode ツール表示の一例

※鏡筒上下方式の正立型顕微鏡 AxioSkop2FS を使用時は、使用する対物レンズを正しく選択しないと Optimal での画素数は正しく表示されません。

・Frame Size（画像の画素数）を選択してください（デフォルトでは 512×512 画素となります）。

Optimalのボタンをクリックすると対物レンズN.A.と波長から最大有効画素数が自動的に設定されます。

スキャニングスピードの設定

・【Acquisition Mode】ツール内の“Speed”で 1 フレーム/秒を決めることができます。

・スピードが速い（**10 以上**）の場合はノイズが多くなる場合があります。

・**8～9** は平均的なスピードです。

・**7** 以下の場合はシグナルのクオリティがよくなりますが、ピクセル当りのレーザ射時間が長くなりますので、退色に注意しなければなりません。（目的とするアプリケーションにより異なります）

ダイナミックレンジの設定

・【Acquisition Mode】内の**“Bit Depth”**からプルダウンで選択できます。

16bit (約 65,536 階調)、12bit（4096 階調）と 8bit（256 階調）の中から選ぶことが可能です。

スキャンアベレージの設定

・最終的に画像を取り込む際に、画像の平均化（アベレージ）を行います。

アベレージにより、ノイズ成分は押さえ、シグナル部分をよりクリアーに表現することが出来るようになります。

ただし、そのぶん試料に長時間レーザ照射することにつながりますので、褪色の激しい試料にはかえってマイナスになる事も考えられます。

回数の設定には十分注意して下さい。

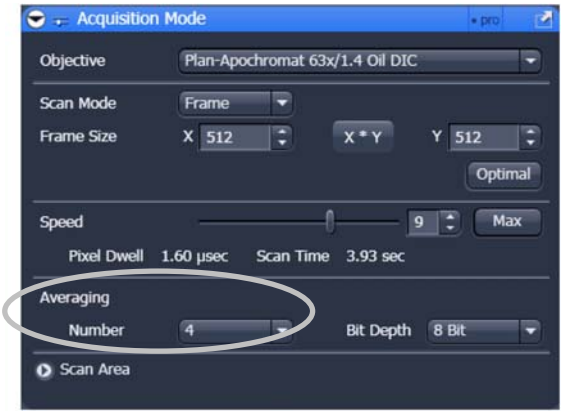


Fig.26 Aquisition Mode

・【Acquisition Mode】の中の**“Averaging”**から設定します（Fig.26）。

☆アベレージングの設定項目について

Mode…Line毎にアベレージング（もしくは積算）するかFrame毎に行うかの選択

Method…シグナルをアベレージング（Mean）か積算（Sum）させるかを選択

Number…アベレージング（もしくは積算）の回数の設定を設定

前頁までの調整がすべて終了したら・・・

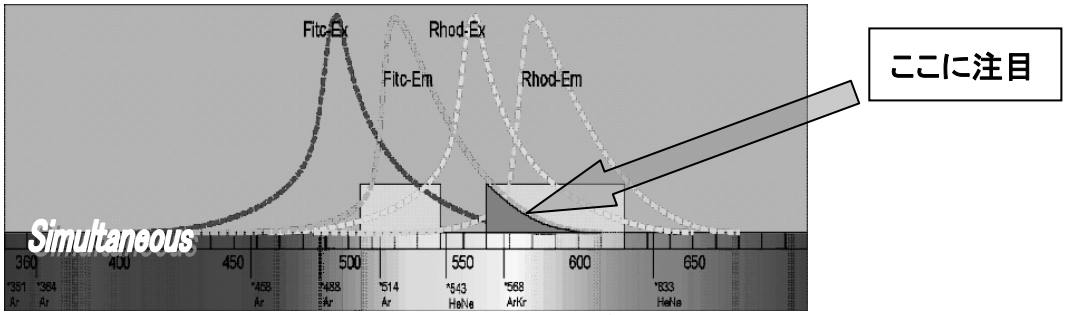
・画質の調整ができましたら、Snap

を行い画像の取り込みをします。

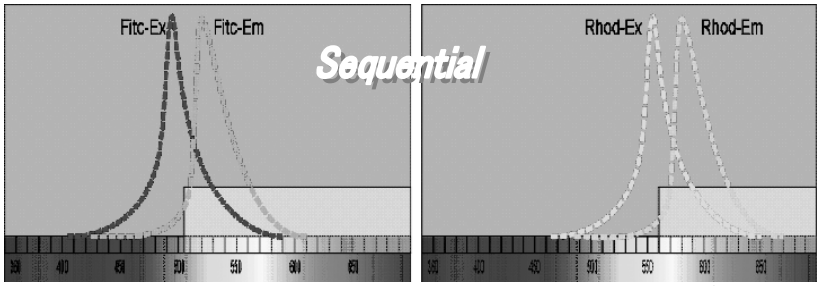
・取得した画像を再度調整する場合は、画像の最適化の手順からやり直してください。

5、Sequential(Multi Track)で画像を取得する

・多重染色のサンプルを LSM5 で画像取得する際、Simultaneous (Single Track) と Sequential (Multi Track) の 2 種類の画像の取り込み方があります。それぞれがどのような動きで画像取得しているのかを以下に比較します。



・Simultaneous (Single Track) では選択した色素に対して、複数のレーザ長を同時に照射(励起)し、出てきた蛍光を同時に検出するようになります。そのため、上図のように Rhodamine の検出波長域に FITC の光が漏れ込んでくることがあります。



・Sequential (Multi Track)では 1 つの画像をスキャンする間に複数の設定をそれぞれ交互に動かし(Line 毎か Frame 毎かは選択できます)、同時に画像の重ね合わせを行います。その為、実質、別々に画像を取得している状態になります。

・ただし、レーザの切り替えによるわずかな時間の差が生じるため、液中に浮遊しているようなサンプルを観察する場合には画素ずれ等が起こる可能性があります。

・使い方は Simultaneous (Single Track)とほとんど変わりませんが、Configuration の設定、最初の画像表示の際の操作(Find の使い方)、検出器の感度＆オフセット調整の部分が若干変わりますので、以下の説明でご確認下さい。

画像の表示 (Multi Track)

・画像ウインドウ左側

で、各チャンネルとMarge状態に分割表示することができます。

多重染色画像においてそれぞれのチャンネルを分けて表示する機能です。

ビューコントローラーの Dimension で Overlay（重ね合わせ画像）の on/off を選択します。

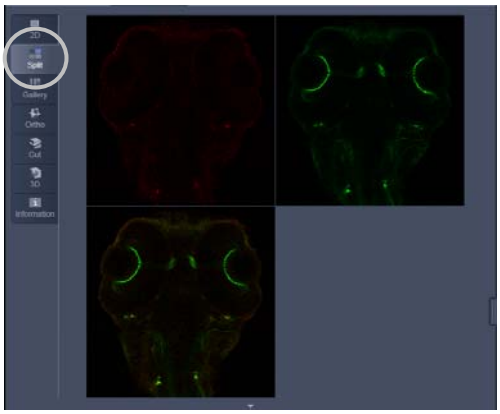
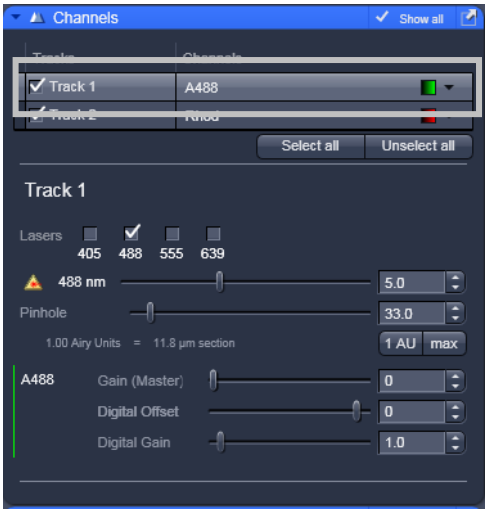


Fig.27 Split 表示(多重染色画像の表示に有効)

Gain(Master) /Digital Offset を調整する

・画像の調整（Master Gain &Digital Offset）はそれぞれの擬似カラーを示すボタンによって切り替えて行います。

・例えば、Track 1 のボタンを選択して調整を行うと緑の画像が、Track 2 のボタンを選択して調整を行うと赤の画像がそれぞれ調整されます。



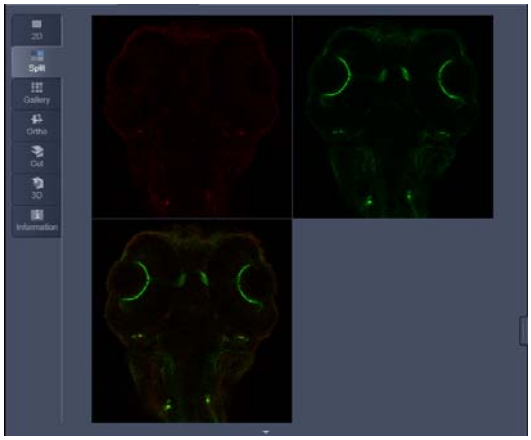


Fig.28 Channels ツール

※コローカライゼーションを解析したい場合は、各チャンネル間で光学切片厚がそろうように Section の値を目安に各チャンネルのピンホール径を調節してください。

6、新規画像の表示 / 画像の保存と読み出し

新規画像の表示ついて

・2D取得した画像は、保存しない限り上書き表示されます。(自動的には保存されません)
・多次元取得画像(ZやTimeを加えた状態)もしくは一度保存された画像は、自動的に上書きされることはありません。

・ “New” ボタンをクリックすると、自動的に新たなイメージウインドを表示します。

・取得した画像は自動的にディスク上に保存されません。必要な画像は必ず手動で保存するようにしてください。

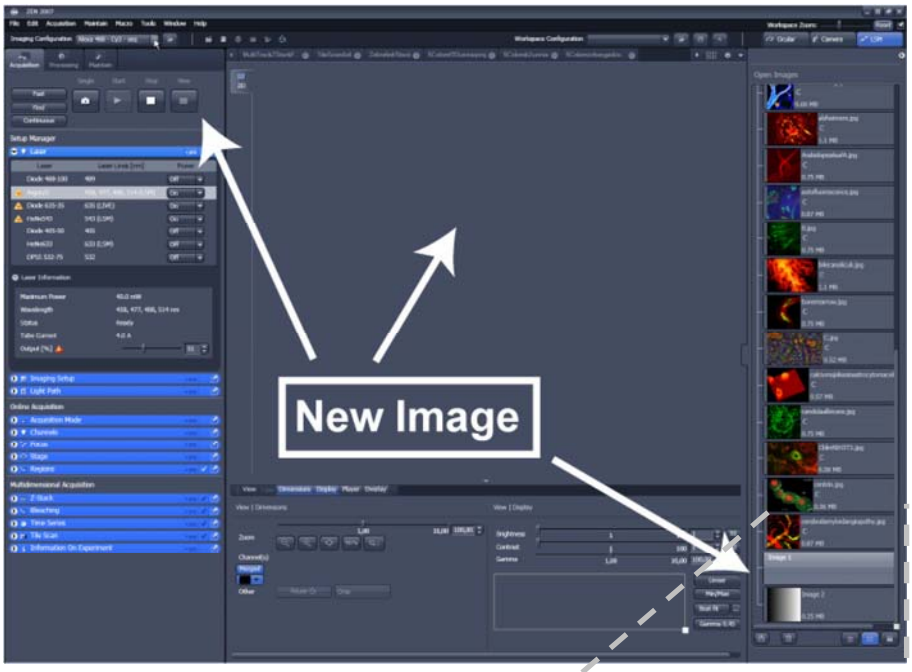


Fig.29 新しくファイルを開いた時に画像が表示されるエリア

・右ツールエリア内の既に取得した画像に Fig. 31 に示されるマークが表示されている場合は保存が完了していません。

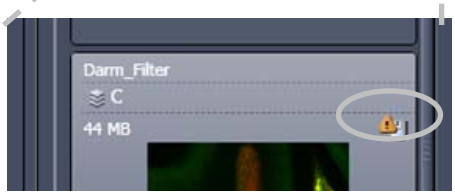


Fig.30 取得画像未保存の表示

データーの保存について

・LSM5では、画像の保存／出力について2つの方法があります。

Ⅰ、.lsm 形式でハードディスクへ保存する（名前を付けて保存）

長所）・登録画像の一括管理が可能（プレビューで確認可能）

・画像取得時の各情報があわせて保存される

短所）・他のソフトで読み出すことはできない

☆Windowsをお使いの方であればZeissホームページよりデータベース画像閲覧ソフト〝ZEN Light Edition〟を無料ダウンロードすることが可能です（機能はかなり制限が有ります）。http://www.microimaging.zeiss.co.jp/

Ⅱ、各種の画像フォーマットを利用して保存（Export）／読み込みを行う

長所）・様々な画像フォーマットで保存可能

短所）・画像取得時の情報は表示されない

・上記2つの保存方法がありますが、基礎となる画像は. lsm 形式で保存し、必要に際して他の画像フォーマットに変換して使用することをお勧めします。

注）画像はC/Dドライブに保存することが可能です。但し、LSM5を共有機器として納入されている場合、不特定多数のユーザーが使用することが考えられます。その場合、コンピューターのハードディスクの管理が非常に難しくなりますので、それらを避けるためデータの一時保存などにはDドライブを使用することをお勧めします。

また、必ず自分のデータのバックアップは実行するようにしましょう。

Ⅰ、.lsm 形式でハードディスクへ保存する

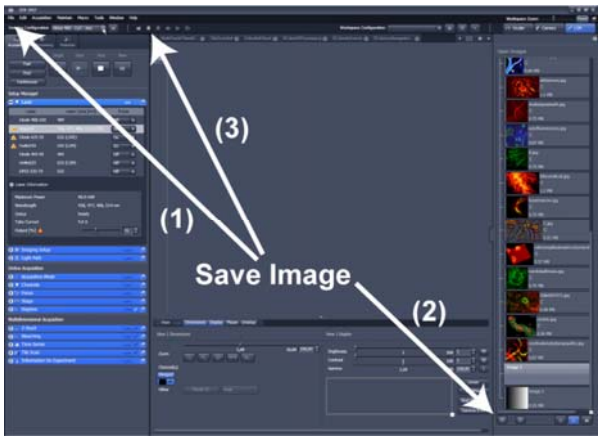


Fig.31 ZEN の中にある画像保存のボタン

・画像の取得/処理が終了したら保存をします。

メニューバーのプルダウンメニューから“File Menu”をクリックし、**“Save”もしくは“Save as”**を選択します。

その他、ZEN の画面の中にはファイルハンドリングエリア （Fig32/2）もしくはメインツールバーの中（Fig32/3） にも Save のボタンがあります。

Fig.32 File 選択画面

・Save のためのウインドウが開きます。
・保存場所、ファイル名を入力し、ファイルフォーマットを選択します。

※ここではファイルフォーマットを**Zeiss LSM 形式（.lsm）**を選択しておいてください。**この形式にしておくと取得した際の諸条件を一緒に保存することが可能です。**

・Save をクリックし、画像の保存を実行します。

Ⅱ-Ⅰ、他の画像フォーマットを利用する（Export）

ここでは他の画像フォーマット（TIFF/JPEG etc. ）で画像を保存したり、それらの画像を読み込んだりする作業について説明します。

Fig.33 Export 画面

他のファイル形式に変換したい場合は**プルダウンメニューの“File Menu”から“Export”**を選択します。

ファイルフォーマットなどを選択し、**“Select file name and save…”をクリック**します。次に開くウインドウから保存場所、ファイル名を入力し、保存の作業を終了します。

・Format：保存したい画像形式を選択します。

・Data：保存したい画像の状態を選びます

- ○ **Raw data**
  画像データのみを変換します
  解像度は保たれますが、スケールバーなどの追加情報は挿入されません
- ○ **Contents of image window**
  モニターの解像度で保存します。
  スケールバーなどの追加情報、Ortho 表示や解析画面を保存できます。
- ○ **Full resolution image window**
  取得した画像の解像度を保った状態で保存します。
  スケールバーなどの追加情報も保存されます。

上記各タイプに関しては連続断層像やタイムラップスなどのシリーズデータについて以下の選択をすることができます。

・**Single plane**　：イメージコンテナー上に表示されている画像を 1 枚保存します。
・**Series**　：シリーズ画像をすべて保存します。
（Movie 形式の場合には1つのファイルとして保存します。

・Compress：圧縮可能なフォーマットを選択した場合には圧縮率の変更が可能です

Ⅱ - Ⅱ、画像を開く （File Browserを利用して画像を開く）

ZENで新たに採用された**【File Browser】**は、ZENソフトウェア上での画像のハンドリングをより簡便に行うための機能です（Ctrl+FもしくはFile Menuからプルダウンで選択）。File Browserはウインドウズのエクスプローラのように、指定したフォルダ内に格納されている画像を、一括で表示することが可能となります。

※　旧バージョンで使用していた Image Database は ZEN では無くなりました。
※　新しい表示機能として**【File Browser】**をお使いいただけます。

①メニューバーの“File”から“New File Browser”を選択します。

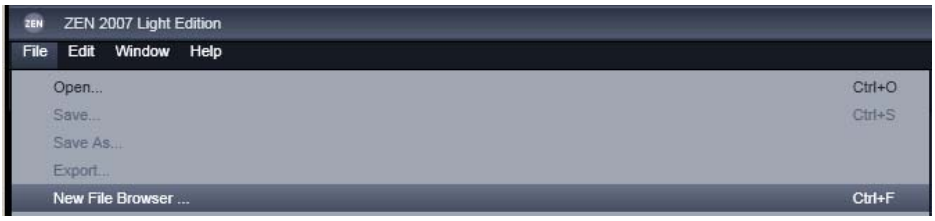


Fig.34 File Menu

②センタースクリーンエリアに File Browser が表示されますので、画像の保存されているフォルダを選択すると、その中に保存されている画像ファイルがサムネイル表示されます。
任意の画像をダブルクリックすると、イメージコンテナー上に表示されます（画像がOpenされた状態になります。）

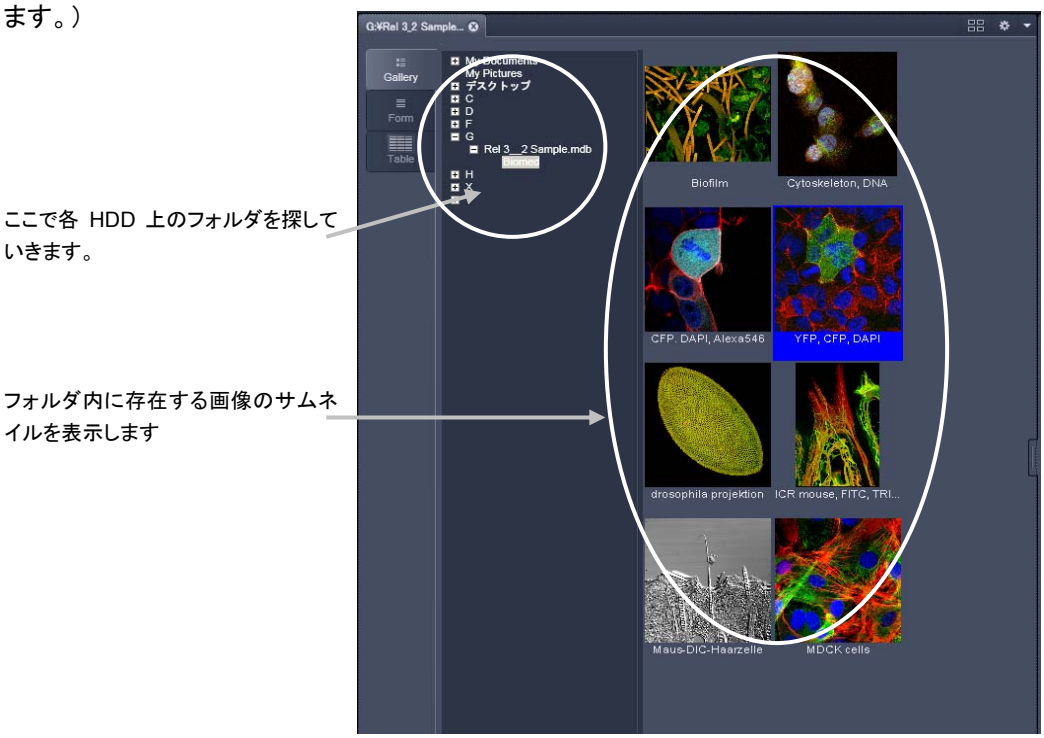


Fig.35 File Browser 画面

Ⅱ - Ⅲ、画像を開く （画像を 1 枚指定して開く）

①メニューバーの“File”から Open、もしくはメインツールバーのフォルダボタンをクリックします。

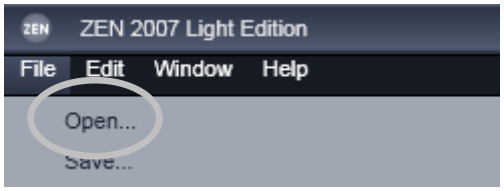


Fig.36 File Menu

Fig.37 File Open ボタン

②ファイル指定の為のウインドウが開きますので、任意のものを選択し開きます。

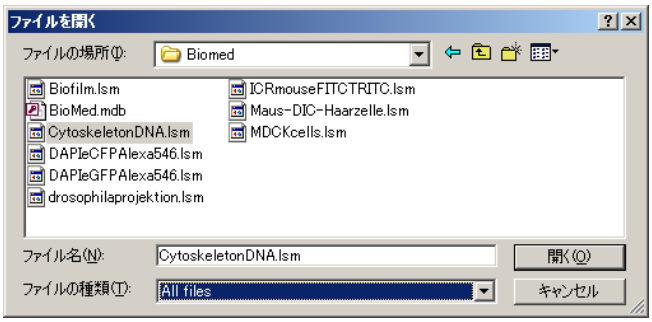


Fig.38 File 選択画面

7、3D 画像の作成について

Zスタックの取得

はじめに

共焦点レーザ微鏡では，Z 軸を動かし連続的に画像を得ていくことで，試料のセクショニング像を得ることができます。セクショニング後，深さ別の擬似カラー付画像や，立体構築，ステレオ画像の作製を行うことが可能です。

立体構築までの流れは以下のようになります。

1）始点（スキャン開始面）と終点（スキャンの終了面）を決め，試料の厚みを見積もる

2）インターバル（画像同士の間隔）と枚数を決め，Sectioning（Scan）を行う

3）画像の操作（立体構築その他）

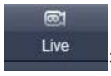
始点と終点を決め、試料の厚みを見積る

注意）この時点でスキャンしたい場所の基礎画像（明るさ、コントラスト）の設定はしておいてください。

Fig.39 Application 選択画面

・左ツールエリア内にある【Z-Stack】にチェックを入れます。

・Z-stack ツール内の “First / Last” を選びます（自分でＺスタックの範囲を決める方法です）。



をクリックし、連続スキャンの状態にします。

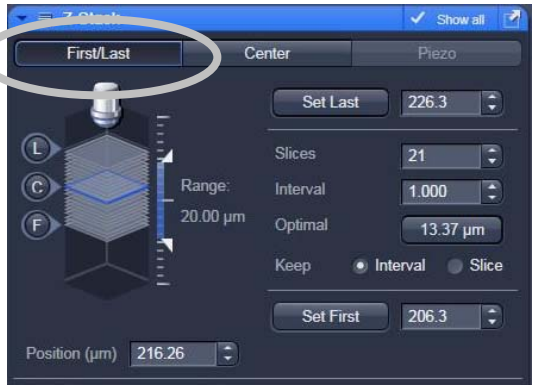


Fig.40 Z-stack ツール表示の一例

①**フォーカスノブを手前方向**に回し、フォーカス位置を下げ、カバーグラスに近い方の面を表示させます。

②**Set First をクリック**し、Z スタックのスタート面を登録します。

③**フォーカスノブを奥の方向**に回し、フォーカス位置を上げ、サンプルの深い面を表示させます。

④**Set Last** をクリックし、Z スタックの終わりの面を登録します。同時にスキャンを Stop します。

⑤インターバル（画像同士の間隔）と枚数を決め、スキャン（セクショニング）を行います。

Optimal ボタンをクリックし、Z スタックのフォーカスインターバルを決定します。

※ **Optimal** では、ピンホール径によって導き出された Optical Slice（光学切片厚）の半値を示します。

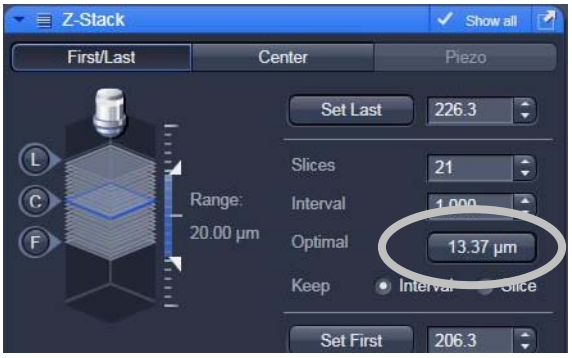


Fig.41 Optimal ボタン選択画面

⑥ **Start Experiment** をクリックし、Z スタックの取得を行います。

※ **Average** の回数や解像度の指定をする場合は、スタートする前に設定しておいてください。

Fig.42 Application スタートボタン

スタック画像の表現方法

※ Z スタック画像の表現方法については次ページ「8.ビュータブについて」をご参照ください。

8. ビュータブについて

画像を表示した際に、画像ウインドウの左側に表示されるタブです。
ビュータブを切り替えることにより、表示方法を変えることができます。
表示されるビュータブの種類は 2D、3D、4D、λ など、取り込み次元の違いにより異なります。

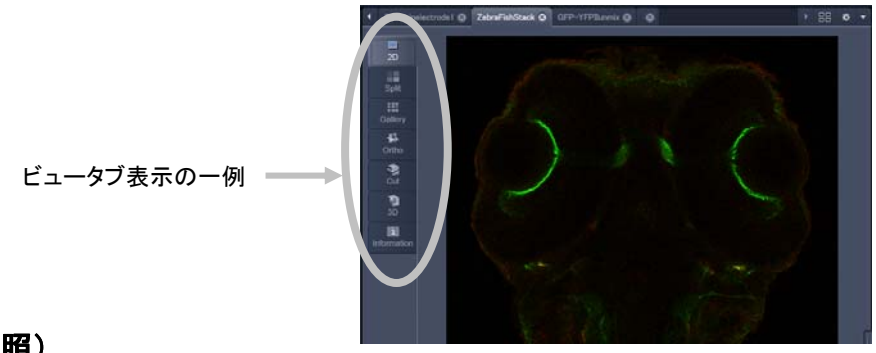
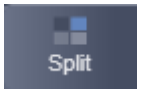


Fig.43 2D の表示 (2 重染色、Z スタック画像)

8-1. 2D（上図参照）

- すべての画像において標準的表示方法です。
- 指定した一枚の画像を表示します。
- 3D、Time Series、λ モード画像の場合は、ビューコントローラーの **Dimension** もしくは **Player** でスタック画像の任意の 1 枚を表示することができます。

8-2. Split（多重染色画像の時に有効）



- 多重染色画像においてそれぞれのチャンネルを分けて表示する機能です。
- ビューコントローラーの Dimension で Merge（重ね合わせ画像）の on/off を選択可能です。

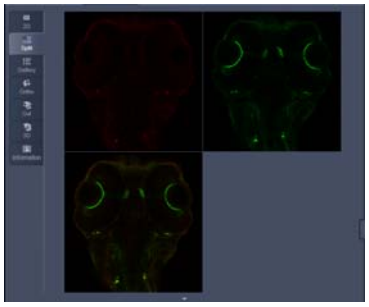


Fig.44 Split 表示

8-3. Gallery（3D、4D、λなどのスタック画像に有効）

- スタック画像に含まれるすべての画像を並べて一括表示する機能です。
- ビューコントローラーの Gallery でZスタックのインターバルや時間などの注釈を入れることが可能です。

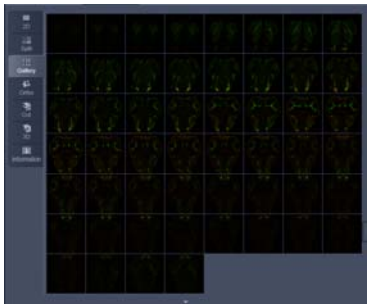
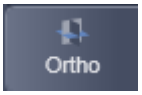


Fig.45 Gallery 表示

8-4. Ortho（Zスタック画像で有効）



・Zスタックの画像における断面表示機能です。
・画面中央の赤、緑のラインを動かすことで、上部/右横にそれぞれの断面像が表示されます。

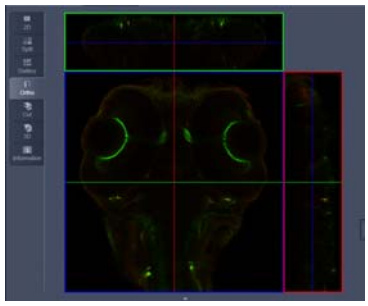


Fig.46 Ortho 画面

8-5. Cut（Zスタック画像で有効）

・自由な角度で断面の観察をすることができます。
・ビューコントローラーの Cut で任意のカッティング面を指定することが可能です。

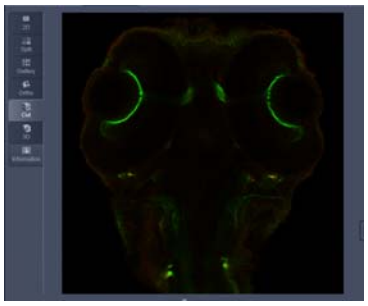


Fig.47 Cut 画面

8-6. 3D（Zスタック画像の 3 次元立体再構築像を作成）

・Z スタックで取得した画像の 3 次元立体再構築を行います。
・ビューコントローラーの 3D 機能を設定することで、さまざまな立体表現を行うことが可能です。
（回転画像の作成については「**9-5. Series**」をご参照ください）

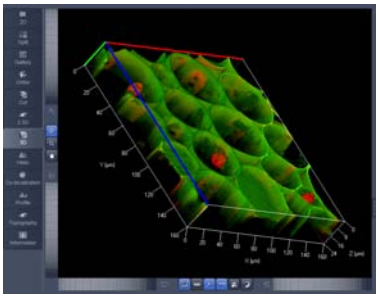


Fig.48 3D 画面

8-7. Histo（ヒストグラムの表示）

・任意の領域内の輝度情報を解析することができます。
・ビューコントローラーの **Histogram** 設定から関心領域を設定し、平均輝度や標準偏差を求めることができます。
※ 数値データをテキストファイルで保存することも可能です。

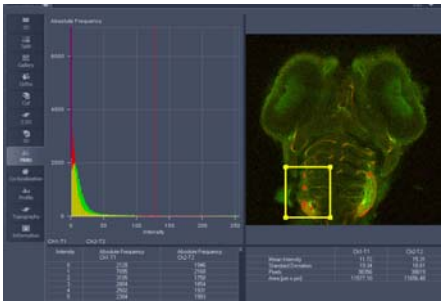
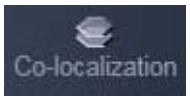


Fig.49 Histogram 解析画面

8-8. Co-localization（共局在解析画面の表示）



・スキャッターグラムを使用し、蛍光２色間の共局在の解析を行えます。
・ビューコントローラーの **Co-localization** 設定から任意の閾値を設定し、共局在部のみ画像化することなども可能です。
※ 数値データをテキストファイルで保存することも可能です。

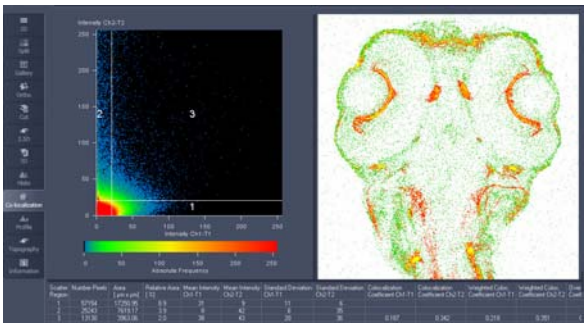
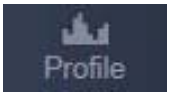


Fig.50 Co-localization 解析画面

8-9. Profile（輝度解析画面の表示）



・画像上に任意で引いた線上の輝度値を表示することができます。
・ビューコントローラーの **Profile** から、測定したい描画の種類（Spline など）を変更し、曲線上の輝度値を表示することも可能です。
※ 数値データをテキストファイルで保存することも可能です。

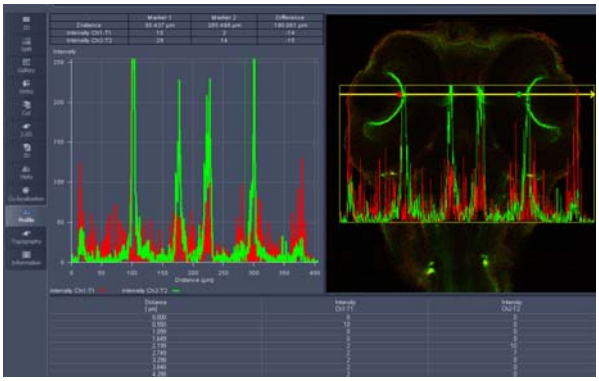


Fig.51 Profile 画面

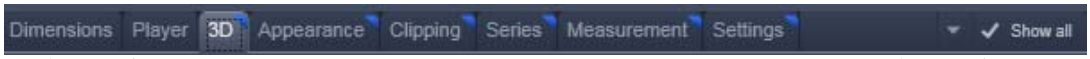
8-10. Information

・画像取得時の装置条件などを表示します。

Fig.52 Information 画面

9. ビューコントローラーについて

ビュータブを選択すると、対応するコントローラーが画像ウインドウ下部に表示されます。



（ビュータブに対応するコントローラーは右肩に青マーカーが入っています。上記は 3D ビュータブ。）

※ ビューコントローラーの全ての機能を表示する場合、コントローラーの右側にある **Show all** を選択してください。

9-1. Dimensions

Fig.53 Dimension 設定画面（3ch 画像の場合）

各ボタンの選択により Merge/Single の切り替え、Ch の on/off、色タブの選択により擬似カラーの変更が可能です

- 表示している画像のズームや表示色の変更を行うことができます。
- Zスタック、タイムシリーズ等のスタック画像については任意スライスの選択、アニメーション表示の制御が可能です。

  Zoom ： 虫眼鏡ツールなどを使用し、モニタ上で**ディスプレイズーム**をかけることができます。

  Channel（s） ： 各チャンネルに対しての表示の on/off、擬似カラーの変更などが行えます。
- **Crop ボタン**をクリックすると、画像中にスキャンエリアを示す矩形が表示されます。矩形の位置やサイズを変更することで**スキャンズーム**をかけることができます。
- **Reuse ボタン**をクリックすると、その画像の取得条件を再現することができます。

9-2. Display

- 取得後の画像に対して、コントラストやブライトネス、ガンマ補正などの調整を行えます。
- 各チャンネルの詳細設定することが可能です。

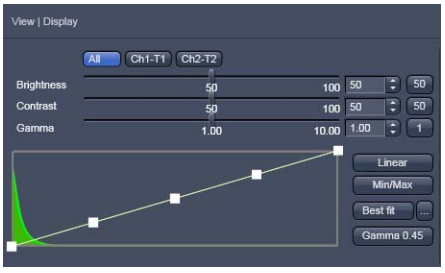


Fig.54 Display 設定画面

9-3. Player

- Z スタック画像、タイムシリーズ画像に対してアニメーション表示の制御を行います。
- 動画のスピードや繰り返し順送り再生などの設定が可能です。

Fig.55 Player 設定画面

9-4. Overlay

・ 画像への描画、注釈、スケールなどの書き込みを行います。
・ 手動での計測(直線、曲線、周長、面積)にも対応しています。

Fig.56 Overlay 設定画面

① **描画ツールの選択**:スケールバーや矢印など代表的な図形ツールの他、パレットツールや Angle ツールなどをプルダウンメニューから選択することができます。

② **描画オブジェクトに対する効果**:Delete、描画線の太さ/色の変更、文字のサイズやフォントの変更が可能です。
Cut region :描画ツールで選択部分を抽出します。
Coordinate :スタック画像にタイムスタンプ、Z スタンプなどを挿入することができます。

③ **Hide** :オーバーレイ情報を隠します。
Number :描画した図形にナンバーリングをします。
Measure :選択した描画の計測を行います。

④ オーバーレイ情報の保存/呼び出しを行います。
保存したファイルには".ovl"の拡張子が付きます。

9-5. Series

・3D 表示画像を合成し、回転画像を作成することができます。

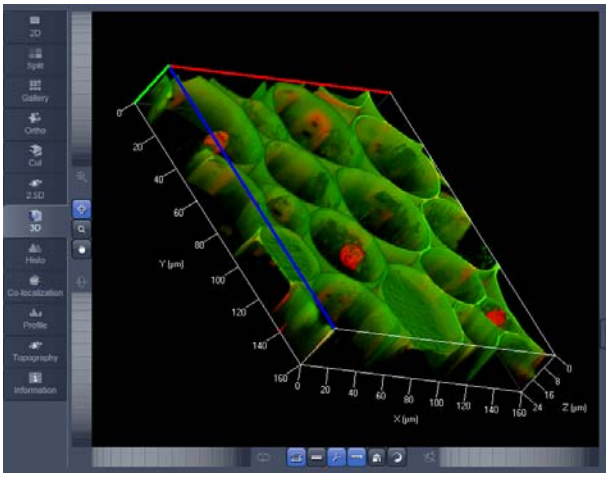


Fig.57 3D 画面

① ビュータブの **3D**

より 3D 表示に切り替えます。

② 表示された 3D 画像を左クリックでドラッグし、見たい角度に動かします。

③ **Series** より回転させたい軸（X , Y など）、回転画像の枚数、画像間の角度を設定します。

（1）回転軸

Render series のプルダウンメニューより回転軸を選択します（X ,Y など）。

（2）回転画像の枚数

Total frames より回転画像を作成するための枚数を指定します。

（3）画像間の角度

360 度回転する動画を作成する場合は、Difference angle より **Panorama** ボタンをクリックします。

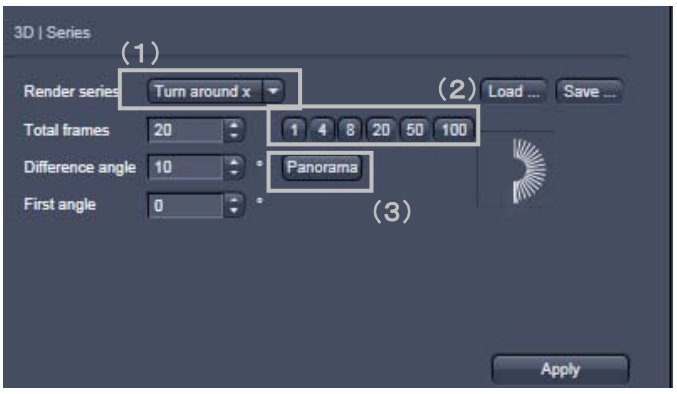


Fig.58 回転画像 設定画面

④ **Apply** ボタンをクリックすると回転画像が作成され、新規の画像として表示されます。

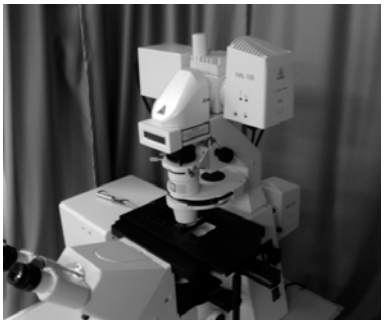
⑤ ビューコントローラーの **Player** から動画再生します。（Player については項目 9-3 をご参照ください）

10、光学顕微鏡による観察（倒立顕微鏡 Axio Observer Z1）

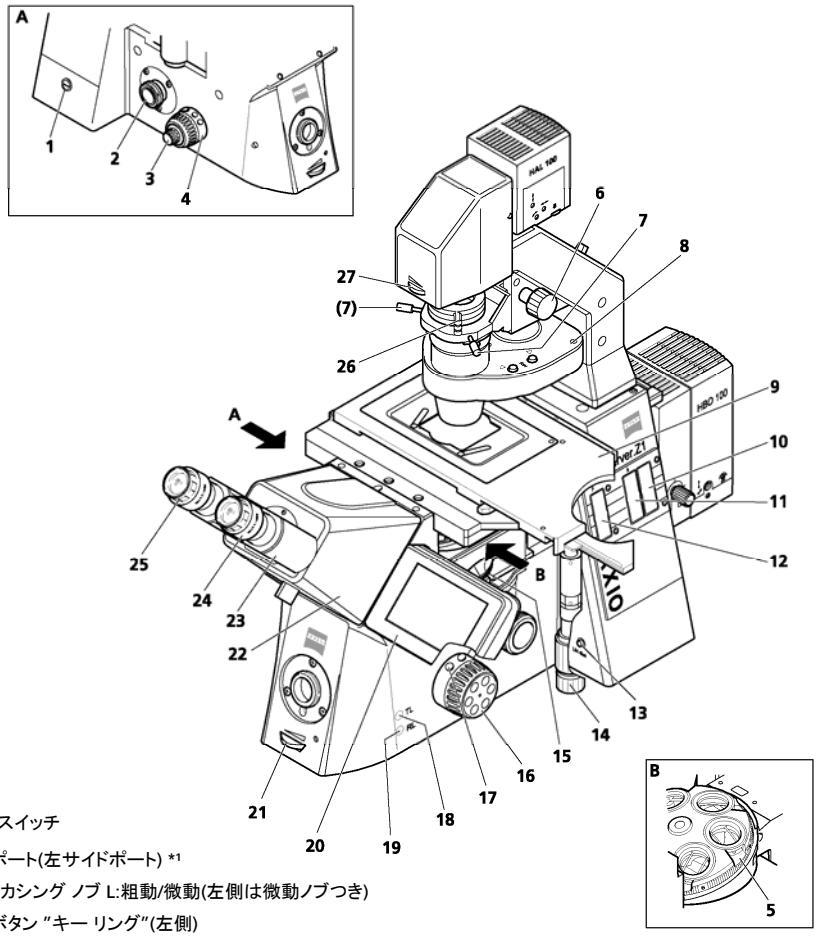
・このシステムはレーザ顕微鏡だけでなく、光学顕微鏡として明視野／微分干渉／位相差／落射蛍光等の観察を行うことも可能です（納入されている対物レンズ／コンデンサの種類により若干異なります）。

・顕微鏡部分のみを使う場合も、LSMシステムの主電源をONにし、ソフトを起ち上げた状態にして下さい。

・Axio Observer Z1はレボルバー（6穴）、蛍光フィルタ最大6個まで）、フォーカスノブ、光路切り替え、蛍光・透過光のシャッタ、透過光調光スイッチが電動制御となっています。
・鏡基にはそれぞれをコントロールするためのボタンが付属しています。暗室内での誤動作を防ぐために、事前に確認をしておいてください。（各ボタンの配置に付いては次ページの図を参照して下さい）
・また、新しくTFTタッチパネルが装備され、電動部分の制御を簡単に行う事が出来るようになりました



鏡筒部分を押し倒すと、ステージ上の空間が広がり試料のセットが簡便になります。
必ずスタンド（支柱の）部分に手を添えて倒してください。
また、観察時には必ず鏡筒部分を立てておくようにしてください。（危険防止のため、レーザが対物レンズから出ないようにする機構が働きます）



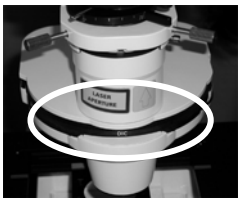
1 メインスイッチ
2 光学ポート(左サイドポート) *1
3 フォーカシング ノブ L:粗動/微動(左側は微動ノブつき)
4 操作ボタン "キー リング"(左側)
5 対物レンズ レボルバ
6 コンデンサ上下動ハンドル
7 コンデンサ センタリングノブ(左右同位置にあります)
8 コンデンサ(1.2 参照)
9 メカニカル ステージ *1
10 25mm フィルタ用スロット
11 反射光開口絞り/フロスト フィルタ スライダ用スロット
12 反射光視野絞りスライダ用スロット
13 LM set ボタン
14 X/Y 軸ハンドル
15 リフレクタ ターレット
16 フォーカシング ノブ L:粗動/微動(右側は平坦)
17 操作ボタン "キー リング"(右側)
18 透過光 On/Off ボタン: ハロゲンランプ側シャッタの開閉を行います. 2 秒以上押しつづけると, 自動的に色温度を 3200 ケルビンに設定します.
19 反射光 On/Off ボタン: 水銀光源側シャッタの開閉を行います.
20 TFT タッチ パネル
21 輝度調整トグルスイッチ: ハロゲンランプ輝度の調節を行います.
22 双眼鏡筒
23 双眼鏡
24 接眼レンズ
25 接眼レンズ視度補正環
26 透過光フィルタ キャリア: 微分干渉組合せの場合は, ポラライザに変更となる場合があります.
27 透過光視野絞り

10－Ⅰ、明視野検鏡

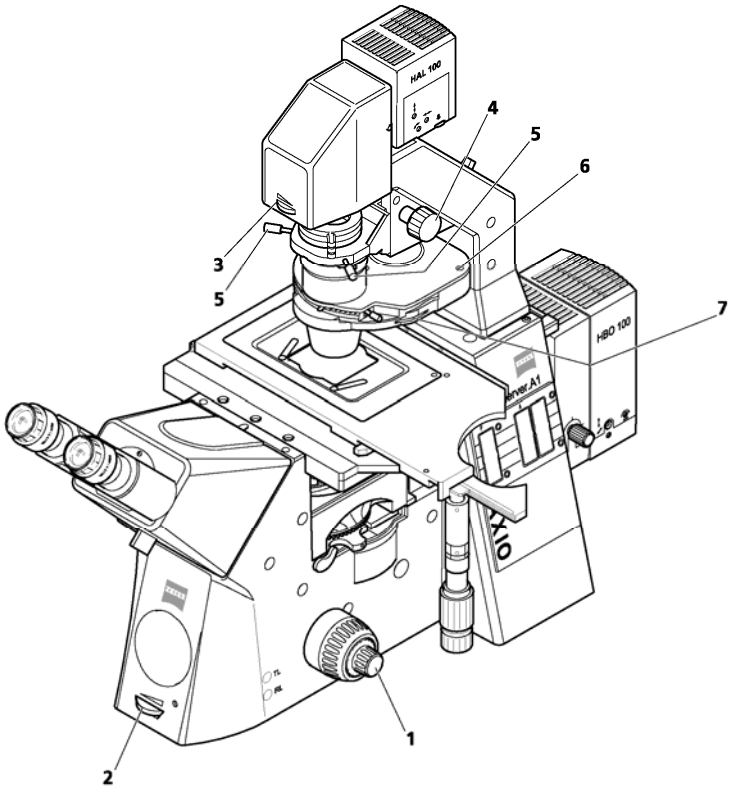
1） 顕微鏡/レーザ路切り換えを行い顕微鏡（Ocular）モードにあることを確認して下さい。

2）鏡基のもしくはTFTパネルから透過光シャッタボタン（HAL on/off）を押し、透過光をONの状態にします。

3）コンデンサーターレットを動かしHのポジションにします



3） 光量調節などを行って観察します。



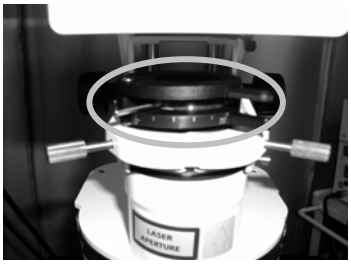
1 フォーカシング ノブ
2 輝度調整トグルスイッチ
3 視野絞り
4 コンデンサ上下動ハンドル
5 コンデンサ センタリング ノブ(左右同位置にあります)
6 LD コンデンサ
7 開口絞りダイアル

注）サンプルの見えが悪いときは、ケーラー照明の調整を行って下さい

10－Ⅱ、透過微分干渉検鏡

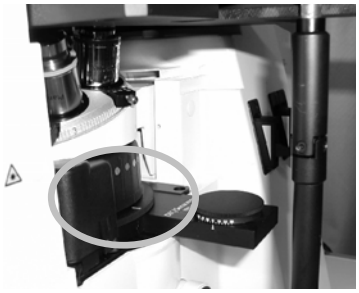
・無染色の標本(~200μm程度)をガラス製ディッシュ，あるいはガラスボトム ディッシュ上で可視化できる検鏡法です．必要なコンポーネントは,**ポラライザ**とコンデンサに内蔵される**DICプリズム**，各対物レンズと専用の**DICスライド**，および対物レンズ レボルバの下に挿入される**アナライザ**です．

1） 2つの偏光板（ポラライザとアナライザ）を光路に挿入して下さい



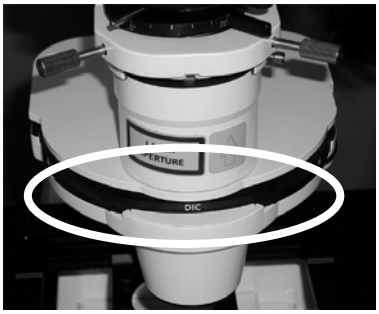
ポラライザ（写真は光路に挿入した状態）
接眼観察時には、角度を0° に合わせます。

注）ポラライザは常に光路に入った状態でかまいません。



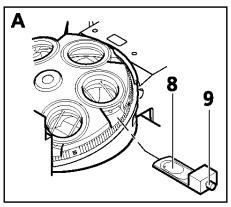
アナライザはリフレクターターレット（蛍光フィルタの入っているところ）に内蔵されています。
PC もしくは顕微鏡本体のボタンを操作し、光路に挿入します。

2） コンデンサを**DICⅡ**または**DICⅢ**に設定して下さい。



DICⅡ：対物レンズは乾燥系の 40 倍まで
DICⅢ：対物レンズは 40 倍以上の油/水浸レンズ

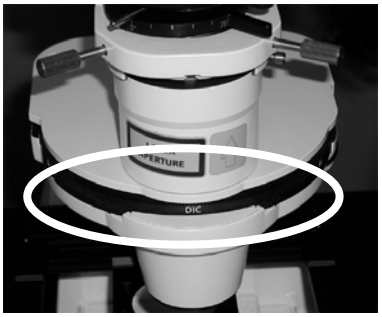
1） DIC像をのぞき、レンズ下部に挿入してあるDICスライダのネジを回し、DICのかかり具合、像のコントラストを最適なものに調節して下さい。



注）観察のため挿入したアナライザ（偏光板）は観察終了後、光路から外しておいて下さい。挿入したままにしておくと蛍光像、LSM像が暗くなります。

10－Ⅲ、位相差検鏡

1）コンデンサをPh1～3（レンズ表面にPh？と表記）の位置にあわせて下さい。



レンズの表記 Ph？にあわせてコンデンサの位置を合わせて下さい。

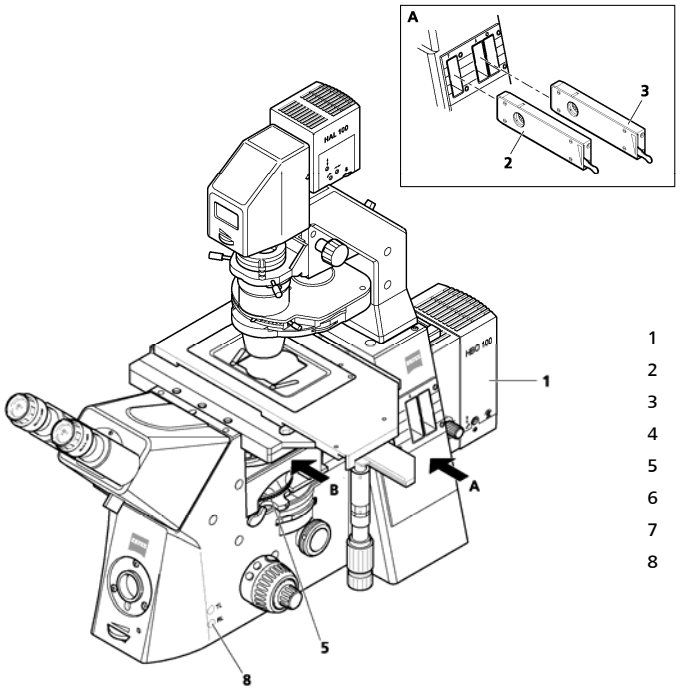
注1） 位相差検鏡は対応した対物レンズ（レンズ表記の文字が緑色のもの）でないと観察できませんので注意して下さい。

注2） **微分干渉検鏡で光路に挿入した偏光板（アナライザー）は光路から外しておいて下さい。**

10－Ⅳ、落射蛍光検鏡

注） 蛍光光源となる水銀ランプの電源がONされていることを確認してください。

1）シャッタ開閉ボタン⑧を押して, シャッタが閉じられていることを確認します.
2）スライダ②のレバーを押し上げて, 絞りを全開にします.
3）フィルタ ターレット⑤を回転させて, 観察したい蛍光色素*1に合致した蛍光フィルタ キューブ④のポジションに合わせます.
4）シャッタ開閉ボタン⑧を押してシャッタを開き, スライダ③のホイールを回転させて適度に励起光を減光させて観察します.



1 ランプ ハウス(HBO)
2 反射光スライダ(Field Stop 位置)
3 反射光スライダ(Aperture Stop 位置)
4 蛍光フィルタ キューブ FL P&C
5 フィルタ ターレット カセット
6 フィルタ ターレット カバー
7 クランプ ノブ
8 反射光シャッタ開閉ボタン

注意）褪色防止のため蛍光のシャッタは観察が終わったらこまめに閉じるようにして下さい。

11、システムの終了（電源のOFF）

1,レーザOFFにします。

左ツールエリア内の【Setup Manager】内の“Laser”ツールを開き、 使用したレーザを Off にします。

・**Blue Diode 405 (405nm)**： standbyをクリックし、offをクリックします。

・**Argon/2 (458/488/514nm)**：standbyをクリックし、Outputを最小値まで下げてから、offをクリックします。

アルゴンレーザは、offにしてから、約5分間、冷却ファンが動いています。 冷却ファンが停止するまでは、5以降の操作を行わないようにしてください。

・**HeNe(543nm、594nm、633nm)**：offをクリックします。

2、ランプ使用時間メーターの数値を記録し、水銀ランプの電源をOFFにします。

3、液浸用対物レンズのクリーニングを行い、最も低倍率のポジションに変えます。

4、LSMのソフトを終了します。**【File】→【Exit】**、最初の画面（Startの画面）でExitを選択します。

5、Windowsを終了させます。画面左下のStart→Shut Downを選択し、終了させます。数秒後にPCの電源も自動的にOFFになります。

6、テーブルタップのスイッチをOFFにします。

※終了後、油浸レンズ・水浸レンズを使用した場合は油及び水をふき取っておいてください。
（クリーニング液の組成：ｎ-ヘキサン　８５％、イソプロパノール　１５％）

※レーザ及び水銀ランプの再点灯は少なくとも 15 分以上時間を置いてから行ってください。